



Los rompimientos cromosómicos y translocaciones modelan el cariotipo trimodal de una población hexaploide de *Milla biflora* (Asparagaceae) de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, México

Chromosome breaks and translocations mold the trimodal karyotype of a hexaploid population of *Milla biflora* (Asparagaceae) from Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, Mexico

Fernando Tapia-Pastrana✉

Laboratorio de Genecología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n. Col. Ejército de Oriente, 09230 México, D. F., México.

✉ pasfer@unam.mx

Resumen. Se empleó una muestra de 30 individuos de una población de *Milla biflora* de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, en México, D. F., para analizar la arquitectura y comportamiento de los cromosomas mitóticos en células de meristemas radiculares. Se empleó una metodología de extendido en superficie y secado al aire (splash) que confirmó un número cromosómico $2n=6x=42$ ($x=7$), permitió determinar la fórmula cariotípica de $6m+24sm+12st$, la obtención de la longitud cromosómica total haploide ($106.92\ \mu m$), la talla cromosómica promedio ($5.09\ \mu m$) y el rango cromosómico ($2.54-9.07\ \mu m$). El índice de asimetría ($TF\%=32.45$) corresponde a un cariotipo asimétrico, mismo que exhibe 3 tipos de cromosomas diferenciados por su talla y forma (trimodal). Las regiones NOR fueron asociadas a cromosomas st portadores de constricción secundaria y satélite. La presencia de rompimientos, fragmentos cromosómicos y heterocromosomas evidencian un mecanismo activo de rearrreglos cromosómicos que moldean el cariotipo de *Milla biflora* y juegan un papel importante en la evolución de la especie. Su naturaleza autohexaploide se discute en función de la presencia de subgrupos cromosómicos, la ausencia de dominancia nucleolar y el papel de la redundancia génica.

Palabras clave: autohexaploide, cromosomas NOR, heterocromosomas, rearrreglos cromosómicos.

Abstract. Thirty individuals from one population of *Milla biflora* from Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, Mexico were sampled to analyze the architecture and behavior of mitotic chromosomes in meristematic root cells. The use of the splash technique allowed the corroboration of the chromosome number $2n=6x=42$ ($x=7$), and to propose the karyotype formula ($6m+24sm+12st$), to obtain the total haploid chromosome length ($106.92\ \mu m$) mean chromosome size ($5.09\ \mu m$) and chromosomal length range ($2.54-9.07\ \mu m$). The asymmetry index ($TF\%=32.45$) correspond to asymmetric karyotype exhibiting 3 differentiated chromosomal types by their shape and size (trimodal). The NOR regions were associated to st chromosomes bearing a secondary constriction and satellite. Chromosome fragments and heterochromosomes show an active mechanism of chromosomal rearrangements that mold the karyotype of *M. biflora* and play an important role in the evolution of the species. Its autohexaploide origin is discussed in function of the presence of chromosome subgroups, absence of nucleolar dominance and the role of gene redundancy.

Key words: autohexaploid, NOR chromosomes, heterochromosomes, chromosomal rearrangements.

Introducción

Milla Cav. es un género americano cormoso alguna vez ubicado dentro de las familias Liliaceae (Cronquist, 1981), Alliaceae (Dahlgren et al., 1985) o Themidaceae (Fay y Chase, 1996; Pires y Sytsma, 2002). Actualmente está situado en Asparagaceae, dentro del clado *Milla*

de la subfamilia Brodiaeoideae Traub (APG III, 2009). El clado *Milla* incluye a los géneros *Bessera*, *Dandya*, *Jaimehintonia*, *Milla* y *Petronymphe* (Moore, 1953; Pires y Sytsma, 2002). El género *Milla* se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta América Central (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2003) y agrupa 10 especies, todas representadas en México y con excepción de *M. biflora*, todos son taxa endémicos del país (Moore, 1953; Lenz, 1971; Howard, 1999; Pires et al., 2001).

Milla biflora Cavanilles, conocida también como estrellita, estrella mexicana, Mexican star, azúcar de campo, guije-cana, flor de San Juan, flor de mayo, eshi-pi-sua, San Nicolás, es una hierba criptofita (geófita) y hermafrodita, localmente abundante en el suroeste de Estados Unidos, Arizona y Nuevo México, y con poblaciones que se extienden hasta Guatemala. En México se localiza en la mayoría de los estados del norte y centro del país en elevaciones medias desde 1 200 a 2 200 m snm y, en ocasiones, hasta 2 700 m snm en áreas montañosas asociadas a pastizales desérticos y chaparral. Posee flores blancas brillantes, actinomorfas, aromáticas, en forma de estrella y hojas lineares delgadas. El pedículo floral puede alcanzar hasta 60 cm de altura, con flores de 6 cm de ancho. *M. biflora* puede producir hasta 6 flores por cormo en especímenes excepcionales, aunque usualmente son sólo 2 flores que abren en secuencia. Dependiendo de las lluvias y probablemente de otros factores florece de junio a septiembre. El fruto es una cápsula con 3 ángulos. Los cormos son superficiales o poco profundos y crecen en áreas rocosas con buen drenaje y en pleno sol. Encuentra usos en la medicina tradicional, pues con la flor se prepara un té para calmar la tos y también se le usa como ornato (Martínez, 1979; Rojo y Rodríguez, 2002; Espejo-Serna y López-Ferrari, 2003; McNeal, 2003).

En la literatura especializada no se encuentra información detallada sobre la arquitectura cromosómica en especies del género *Milla* y sólo se registran recuentos cromosómicos donde sobresalen algunas especies con números diploides variables como *M. mexicana* con $2n=16$ y 54 , y *M. potosina* con $2n=18$, 32 y 42 , en tanto, que otras exhiben un solo número diploide como es el caso de *M. oaxacana*, $2n=16$ y *M. rosea*, $2n=20$ (Howard, 2001). En relación con *M. biflora* se han registrado recuentos, tales como $2n=14$, 28 y 42 , que corresponden a una serie poliploide con número base $x=7$, con diploides, tetraploides y hexaploides. En otros 2 recuentos se ha observado un $2n=16$ y 48 (Lenz, 1971).

En la presente investigación se realizó un análisis citogenético empleando una metodología de extendido y secado al aire del tejido meristemático para estudiar y describir el cariotipo, establecer la fórmula cariotípica y otras características cuantitativas del complemento cromosómico de una muestra de individuos de *M. biflora* de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) en México, D. F. y, de esta manera, obtener datos citológicos fundamentales del sistema genético de esta especie, la cual presenta la mayor distribución geográfica dentro del género y es común en dicha reserva.

Materiales y métodos

Los frutos de *M. biflora* se recolectaron durante los meses de octubre de 2007 y 2008 en un área de amortiguamiento; A5, Paseo de las Esculturas, de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) de Ciudad Universitaria, en el sur de la cuenca del valle de México; entre $19^{\circ}20'2''$ y $19^{\circ}13'45''$ N, $99^{\circ}08'26''$ y $99^{\circ}14'3''$ O; 2 250 a 2 350 m snm. Semillas seleccionadas al azar provenientes de al menos 30 individuos fueron puestas a germinar a temperatura ambiente y en luz natural en cajas de Petri con algodón humedecido con agua destilada. Las raíces de 2-4 mm de largo fueron cortadas y pretratadas en 8-hidroxiquinoleína 0.002 M durante 5 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, fueron fijadas en solución Farmer; etanol-ácido acético, 3:1. Para la obtención de los cromosomas en metafase se siguió el método de secado al aire propuesto por Tapia-Pastrana y Mercado-Ruaro (2001), el cual se basa en la maceración enzimática (pectinasa 20%+celulasa 2%) de los meristemos apicales durante 2 h a 37°C , seguido de la transferencia de los protoplastos a una solución fresca de KCl 0.075 M durante 15-20 minutos a 37°C . Posteriormente, se realizaron 2 lavados con la misma solución y el botón celular fue fijado en solución Farmer. Dos gotas del botón celular se colocaron sobre portaobjetos limpios y la tinción de los cromosomas se realizó con Giemsa al 10%. Las preparaciones se hicieron permanentes empleando Entellán Nuevo (Merck) o resina sintética (Sigma) como medios de montaje. Los mejores campos fueron fotografiados con un microscopio óptico Zeiss Axioscop, usando película Kodak Technical Pan.

Se utilizó un vernier digital (Mitutoyo Digimatic Caliber CD-G''BS) para establecer las tallas cromosómicas y otras medidas morfométricas sobre 5 fotografías de placas en metafase típica con similar grado de condensación y amplificadas con la misma magnificación. Para la obtención de la fórmula cariotípica y nomenclatura, se aplicó el sistema propuesto por Levan et al. (1964). La proporción de brazos, r , se obtuvo mediante el cociente q/p , valor que muestra la relación del brazo largo entre el brazo corto de los cromosomas individuales. La proporción de la suma total de longitudes de brazos cortos respecto a la suma total de longitudes cromosómicas como indicador de simetría o asimetría de un cariotipo (TF%) se realizó según Sinha y Roy (1979).

Resultados

Se observaron un total de 223 células en metafase, de las cuales 208 exhibieron un $2n=6x=42$ (Fig. 1); 4 mostraron un $2n=41$ (Fig. 2); en 4 células se observó un

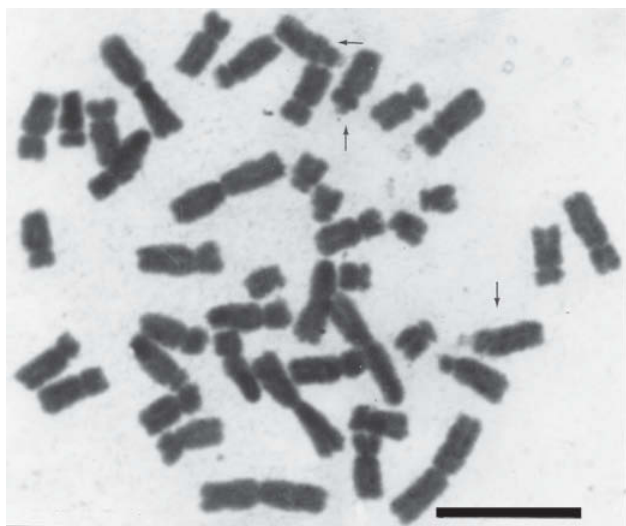


Figura 1. Complemento cromosómico hexaploide $2n=6x=42$ de *M. biflora*. Las flechas señalan cromosomas con constricciones secundarias y satélites. Barra= 10 μm .

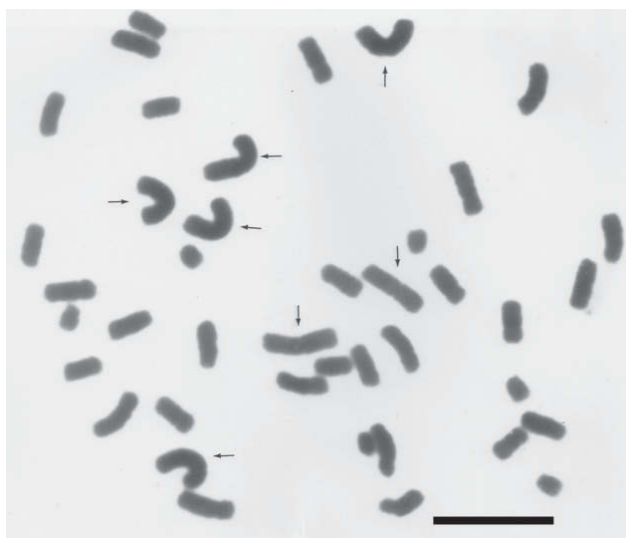


Figura 2. Metafase mitótica de *M. biflora* $2n=41$. Las flechas señalan 7 cromosomas metacéntricos grandes. Barra= 10 μm .

$2n=43$ (Fig. 3) y en 7 células se apreciaron 1 o 2 fragmentos cromosómicos de diversos tamaños (Fig. 4). La fórmula cariotípica obtenida fue $6\text{ m}+24\text{ sm}+12\text{ st}$ (Fig. 5A, B; Cuadro 1). La longitud cromosómica total haploide media (LCTH) fue $106.92\pm 5.87\text{ }\mu\text{m}$ y el tamaño cromosómico promedio se estableció como $5.09\pm 0.55\text{ }\mu\text{m}$, con un rango (diferencia de longitudes entre los cromosomas mayor y menor) de $6.53\text{ }\mu\text{m}$. El índice de asimetría ($\text{TF}\%=32.45$) señala un complemento cromosómico asimétrico. El



Figura 3. Metafase mitótica de *M. biflora* $2n=43$. Barra= 10 μm .

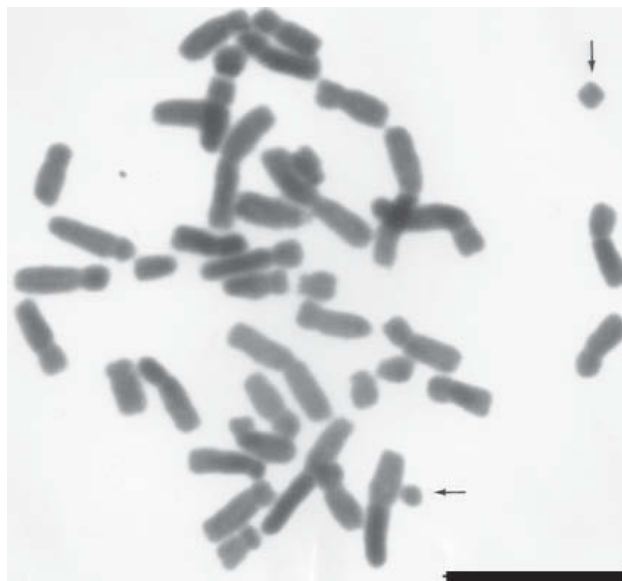


Figura 4. Metafase mitótica de *M. biflora* donde resaltan 2 fragmentos de diferente tamaño (flechas). Barra= 10 μm .

complemento cromosómico de *M. biflora* es claramente trimodal. En su cariotipo resaltan 3 pares de cromosomas metacéntricos (m) notoriamente grandes (ca. $9\text{ }\mu\text{m}$) y 3 pares de cromosomas comparativamente más pequeños con centrómero desplazado (sm) de entre 2 y $3\text{ }\mu\text{m}$ (Cuadro 1). Un grupo intermedio está conformado por

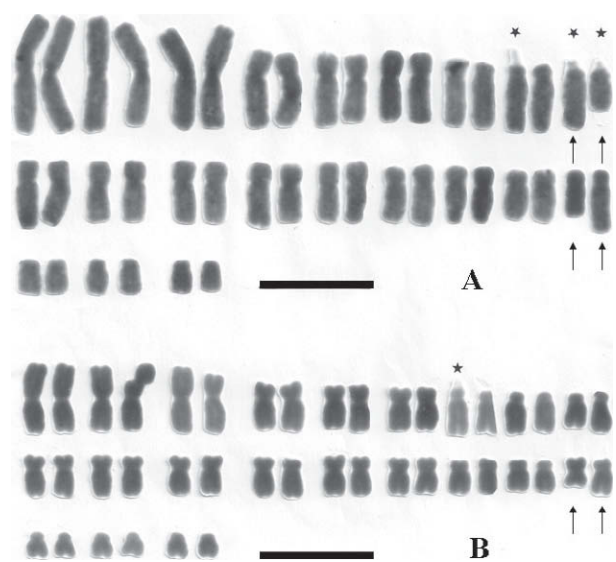


Figura 5. A, B, cariotipos de *M. biflora* ($2n= 6x= 42$). Los cromosomas se muestran alineados por el centrómero y en orden decreciente de tamaño. En B, se aprecia un rompimiento en un cromosoma metacéntrico grande. Las flechas señalan heterocromosomas.* Cromosomas con satélite. Escala= 10 μ m.

Cuadro 1. Medidas cromosómicas promedio en *Milla biflora* obtenidas de 6 células en metafase mitótica. Abreviaturas: PC= par cromosómico; LC= longitud cromosómica en μ m; LBL= longitud brazo largo en μ m; LBC= longitud brazo corto en μ m; r= proporción del brazo largo (q) entre el brazo corto (p) de los cromosomas; N= Nomenclatura; *= cromosoma con constricción secundaria y satélites; m= metacéntrico; sm= submetacéntrico; st= subtelocéntrico

PC	LC	LBL(q)	LBC(p)	R	N
1	9.07	4.76	4.30	1.10	m
2	8.63	4.57	4.11	1.11	m
3	8.26	4.40	3.85	1.14	m
4	6.06	4.16	1.90	2.18	sm
5	5.71	3.89	1.82	2.13	sm
6	5.58	4.52	1.04	4.34	st*
7	5.50	3.71	1.79	2.07	sm
8	5.19	3.61	1.66	2.17	sm
9	5.03	4.08	0.93	4.32	st
10	4.98	3.36	1.63	2.06	sm
11	4.87	3.34	1.53	2.18	sm
12	4.77	3.19	1.59	2.00	sm
13	4.72	3.85	0.86	4.47	st*
14	4.57	3.15	1.43	2.20	sm
15	4.36	3.06	1.35	2.26	sm
16	4.12	3.25	0.86	3.77	st
17	3.85	2.96	0.89	3.32	st
18	3.50	2.75	0.74	3.71	st*
19	2.94	2.07	0.89	2.32	sm
20	2.67	1.87	0.80	2.33	sm
21	2.54	1.79	0.73	2.45	sm

cromosomas submetacéntricos (sm) y subtelocéntricos (st) con tallas de entre 3.5-6.0 μ m (Figs. 5A, B, 6). Asimismo y sin ambigüedad, fue posible reconocer la presencia de una a 6 constricciones secundarias asociadas a satélites de diferentes tamaños, todas situadas en los brazos cortos de cromosomas st (Fig. 7). Las células en prometáfase exhibieron un número máximo de 2 nucleolos de apariencia grande, cada uno asociado exclusivamente con un cromosoma st, cuya constricción secundaria y satélite se encontraron adyacentes, e incluso inmersos en la matriz nucleolar (Fig. 8).

Por otra parte, se identificaron con claridad sitios de rompimientos en cromosomas de diferentes tamaños

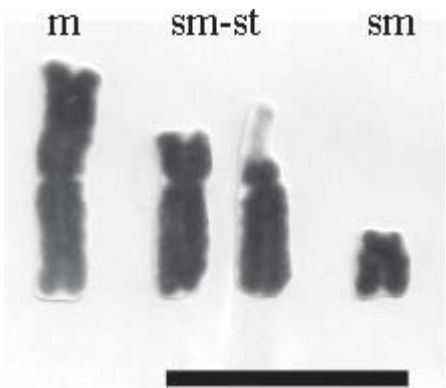


Figura 6. Tipos cromosómicos en el complemento trimodal de *M. biflora*. m= metacéntricos grandes; sm-st^{sat}= submetacéntricos y subtelocéntricos medianos; sm= chicos. sat= portadores de satélites. Escala= 10 μ m.

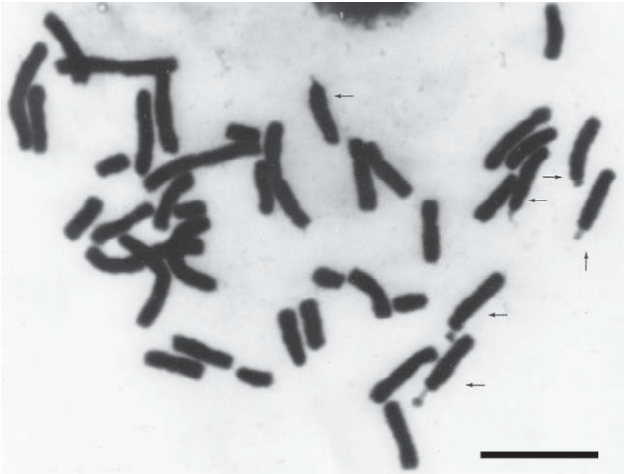


Figura 7. Metafase mitótica de *M. biflora* ($2n= 6x= 42$). Las flechas señalan a 6 cromosomas subtelocéntricos que portan constricciones secundarias y satélites de diversos tamaños. Escala= 10 μ m.

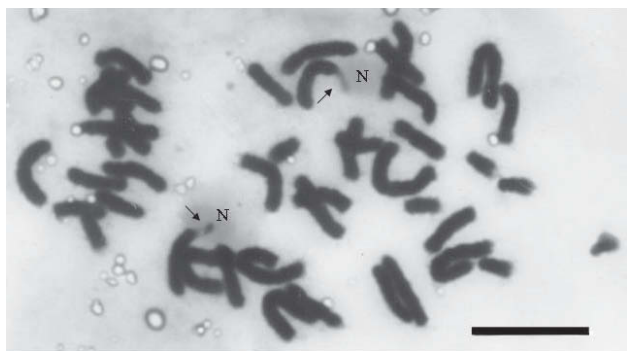


Figura 8. Prometáfase mitótica de *M. biflora* ($2n = 6x = 42$). Se aprecian 2 cromosomas con constricciones secundarias y satélites (flechas) inmersos en nucleolos (N) de aspecto circular. Escala= 10 μ m.

(Figs. 9, 10); asimismo, se reconocieron cromosomas que no correspondieron con la fórmula cariotípica propuesta en este estudio, esto es, no coincidieron con la morfología o talla de alguno de los 3 tipos básicos que conforman el complemento cromosómico. Tales cromosomas excepcionales o heterocromosomas fueron semejantes a cromosomas metacéntricos chicos o grandes que ocasionalmente portaron constricciones secundarias

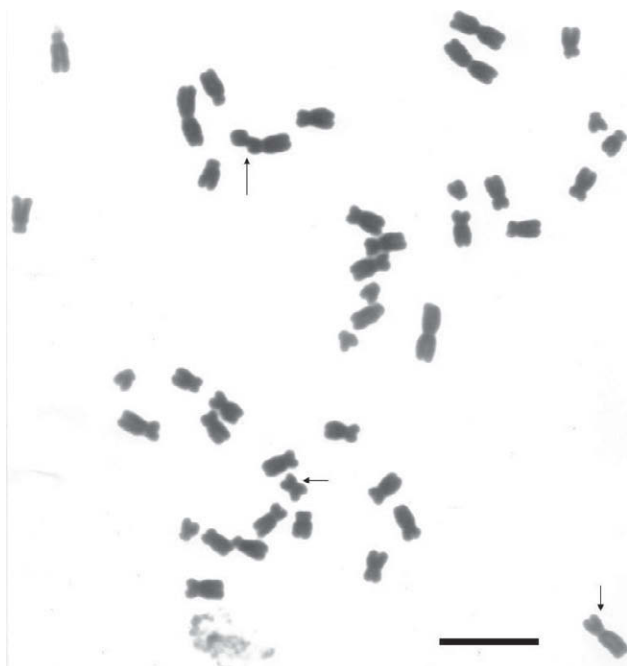


Figura 9. Rearreglos cromosómicos observados en un complemento cromosómico de *M. biflora* ($2n = 6x = 42$). Rompimiento cromosómico (flecha larga); heterocromosomas metacéntricos (flechas cortas). Escala= 10 μ m.

(Figs. 10, 11, 12), y a submetacéntricos ligeramente mayores a los 6 más pequeños del complemento (Fig. 13).

Discusión

El número cromosómico $2n = 42$ registrado en estas investigaciones para *M. biflora* coincide con recuentos obtenidos anteriormente para esta especie y corresponde al de una población hexaploide con un número básico $x = 7$, lo que confirma la existencia de una serie poliploide exhibida dentro del amplio intervalo de distribución de este taxón (Lenz, 1966, 1971). Asimismo, concuerda con $x = 7$ que ha sido reconocido como el número básico de las angiospermas

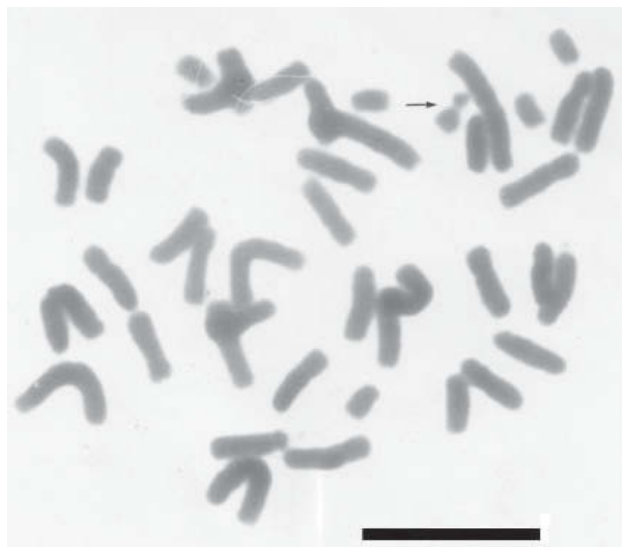


Figura 10. Rompimiento cromosómico (flecha) en un complemento de *M. biflora* ($2n = 6x = 42$). Escala= 10 μ m.

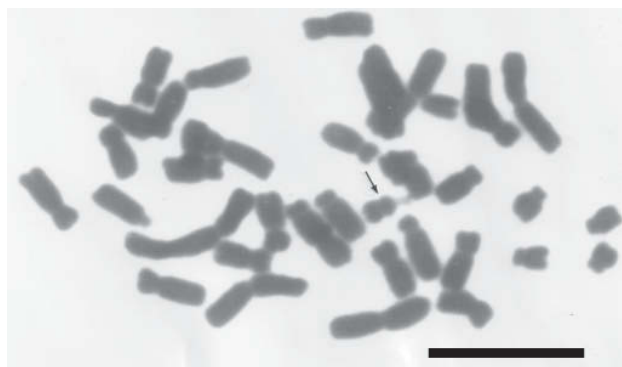


Figura 11. Metafase mitótica de *M. biflora*. La flecha señala a un heterocromosoma metacéntrico chico con constricción secundaria. Escala= 10 μ m.

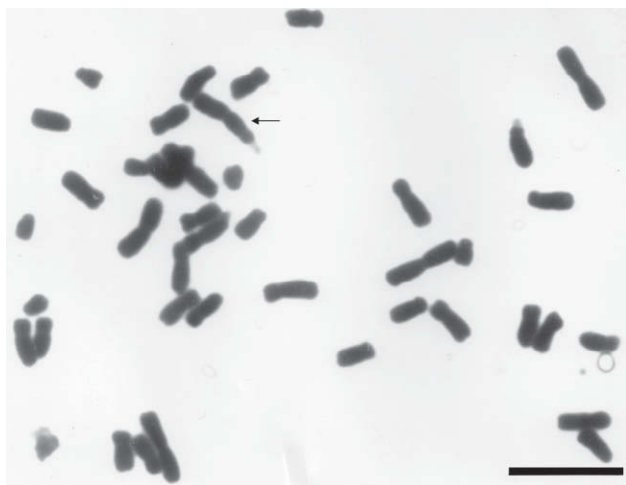


Figura 12. Metafase mitótica de *M. biflora* ($2n= 6x= 42$). La flecha señala a un heterocromosoma metacéntrico grande con constricción secundaria. Escala= 10 μ m.

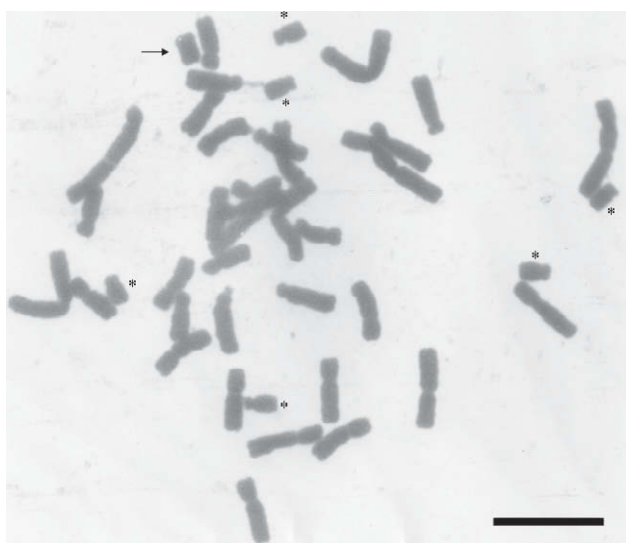


Figura 13. Metafase mitótica de *M. biflora* ($2n= 6x= 42$). La flecha resalta a un heterocromosoma submetacéntrico ligeramente mayor a los 6 cromosomas submetacéntricos (*) más pequeños. Escala= 10 μ m.

basales y predominante en las monocotiledóneas (Raven, 1975; Dahlgren et al., 1985).

La fórmula cariotípica de $6m+24sm+12st$ para la población de *M. biflora* estudiada aquí, representa la primera que se obtiene para cualquiera de sus poblaciones y primera también para cualquiera de las especies del género. En relación con las tallas cromosómicas, una LCTH de $106.92\pm 5.87 \mu$ m con un tamaño cromosómico

promedio de $5.09\pm 0.55 \mu$ m, señala una característica ya conocida en las monocotiledóneas cormosas, es decir, la presencia de genomas particularmente grandes con probable significado nucleotípico. La fórmula cariotípica, así como la obtención del rango cromosómico (6.53μ m) y del índice de asimetría ($TF\%= 32.79$) añaden datos cuantitativos al sistema genético de *M. biflora*, tan escasos en las descripciones cariotípicas de monocotiledóneas.

El carácter trimodal, es decir, la presencia de 3 grupos de cromosomas bien caracterizados, con tallas claramente diferentes, observado en el cariotipo de *M. biflora*, ha sido descrito con anterioridad en Asparagales en los géneros *Aspidistra*, *Galtonia*, *Pseudogaltonia*, *Maianthemum* y otros géneros pertenecientes a otros órdenes y familias (*Craspedolobium*, Fabaceae) y el significado genético y taxonómico de este fenómeno queda por resolver (Forrest y Jong, 2004; Meng et al., 2005; Lin et al., 2010; Xu et al., 2011).

La identificación clara de grupos de 6 cromosomas homólogos observada en los cromosomas metacéntricos (m) grandes y en los submetacéntricos (sm) chicos (Figs. 5A, B) se consideró aquí como una evidencia de la naturaleza autohexaploide de la población estudiada, donde se observaron 6 homólogos para cada grupo de cromosomas del complemento. La idea anterior se reforzó con la observación frecuente de 6 cromosomas subteloecéntricos (st) portadores de constricciones secundarias y satélites (Fig. 7) que demuestra, además, la ausencia de supresión de la función nucleolar por amfiplastia o dominancia nucleolar, habitualmente manifestada en especies aloploidoides (Navashin, 1928; Preuss y Pikaard, 2007; Tapia-Pastrana, 2012).

En general, la presencia de constricciones secundarias en un complemento se considera indicativo de regiones NOR activas (Tapia-Pastrana y Mercado-Ruaro, 2001; Tapia-Pastrana, 2007), sin embargo, en la población analizada el número máximo de nucleolos observados en prometafase fue de 2, lo que indica por una parte, que los cromosomas st asociados a éstos son los cromosomas NOR (Fig. 8) y, por otra, que la redundancia genética por copias extras de ciertas secuencias no compromete funciones esenciales en los poliploides.

En estas investigaciones, la identificación de 3 tipos básicos de cromosomas en *M. biflora* a partir de la ubicación del centrómero, descarta la existencia de cromosomas holocéntricos o con centrómero difuso, fenómeno que la investigación citogenética registra como una característica más común en monocotiledóneas (Leitch et al., 2010) que en el resto de las angiospermas: Cyperaceae (Heilborn, 1924), Juncaceae (Malheiros-Gardé et al., 1947; Heckmann et al., 2011) y el género *Chionographis* de Melanthiaceae (Tanaka y Tanaka, 1977), ejemplifican lo anterior, aunque

la frecuencia del evento aún se desconoce (Greilhuber, 1995).

Al analizar el complemento cromosómico en algunos individuos de la población de *M. biflora* estudiada, se observó la presencia de fragmentos cromosómicos de diferentes tamaños, la existencia de rompimientos y de heterocromosomas, mismos que se consideraron como evidencia de rearrreglos cromosómicos donde la probable participación de rompimientos y translocaciones desiguales es un mecanismo frecuente, cuyo resultado es la falta de homología en algunos grupos de cromosomas y la consecuente dificultad para aparearlos por semejanza al construir el cariotipo de esta especie (Figs. 5A, B). Los resultados de estas investigaciones apoyan la opinión de Stebbins (1971) sobre el papel de las translocaciones desiguales progresivas entre cromosomas, que al favorecer el acortamiento de algunos cromosomas y el alargamiento de otros, resultaron en nuevas combinaciones alélicas que han explicado el origen bimodal en los cariotipos de las monocotiledóneas. En efecto, las especies poliploides frecuentemente muestran gran cantidad de cambios cromosómicos que producen nuevas combinaciones de ADN en sus genomas (Song et al., 1995; Arnold, 1997).

Es importante señalar que la información derivada de los estudios citogenéticos en algunas familias de monocotiledóneas, tales como Poaceae, Commelinaceae y Asparagaceae ha contribuido de manera sustancial en la estimación de las relaciones filogenéticas (Raven, 1975; Dahlgren et al., 1985) y que el número cromosómico por sí solo ha sido útil para analizar la posición taxonómica de especies incluidas en otros géneros de la subfamilia Brodiaeoideae como *Bloomeria* y *Triteleia*. En este taxón, especies polimórficas exhiben poliploidía y números básicos de $x=7$ y $x=8$, lo cual sugiere que los cambios en el número cromosómico juegan un papel significativo en la evolución de estas especies (Burbank, 1941, 1944).

Si bien, el análisis citogenético tiene poca aplicación en niveles superiores de la taxonomía, debido a la plasticidad evolutiva y a datos morfológicos limitados, en las monocotiledóneas puede suministrar información útil particularmente por abajo del nivel de género (Greilhuber, 1995). De esta forma, es claro que el estudio cromosómico detallado en especies incluidas dentro del género *Milla* puede sumarse ahora a la lista de caracteres morfológicos confiables para la construcción de hipótesis evolutivas en Brodiaeoideae, particularmente si se considera que los intentos por resolver sus relaciones filogenéticas empleando secuencias de cloroplasto, tales como *trnL-F*, *rp116* y *ndhF* han presentado escasa variación (Pires y Sytsma, 2002).

Finalmente, este estudio apoya la opinión de Greilhuber (1995), quien señala que en la era posgenómica de la

secuenciación a gran escala y los análisis comparativos, la disponibilidad de grandes cantidades de información de secuencias junto con cantidades crecientes de información citogenética derivada del estudio cuidadoso de los cromosomas, suministrará nueva luz sobre las hipótesis de relación o filogenias.

Literatura citada

- APG III (Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161:105-121.
- Arnold, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press. New York. 232 p.
- Burbank, M. P. 1941. Cytological and taxonomic studies in the genus *Brodiaea*. *Brodiaea* and *Dichelostemma*. Botanical Gazette 103:247-265.
- Burbank, M. P. 1944. Cytological and taxonomic studies in the genus *Brodiaea* II. Botanical Gazette 105:339-345.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. 1262 p.
- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford y P. F. Yeo. 1985. The families of monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer Verlag, Berlin. 520 p.
- Espejo-Serna, A. y A. R. López-Ferrari. 2003. Alliaceae. Flora de Veracruz. Fascículo 132. Instituto de Ecología., A. C. Xalapa and University of California. Riverside, California. 18 p.
- Fay, M. F. y M. W. Chase. 1996. The resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. Taxon 45:441-451.
- Forrest, L. L. y K. Jong. 2004. Karyotype asymmetry in *Galtonia* and *Pseudogaltonia* (Hyacinthaceae). Edinburgh Journal of Botany 60:569-579.
- Greilhuber, J. 1995. Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In Monocotyledons: systematics and evolution, P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler y C. J. Humphries (eds.). Royal Botanic Gardens, Kew. p. 379-414.
- Heckmann, S., E. Schroeder-Reiter, K. Kumke, L. Ma, K. Nagaki, M. Murata, G. Wanner y A. Houben. 2011. Holocentric chromosomes of *Luzula elegans* are characterized by a longitudinal centromere groove, chromosome bending, and terminal nucleolus organizer region. Cytogenetic and Genome Research 134:20-228.
- Heilborn, O. 1924. Chromosome numbers and dimensions, species formations and phylogeny in the genus *Carex*. Hereditas 5:128-216.
- Howard, T. M. 1999. Three new *Milla* species from Mexico. Herbetia 54:232-237.
- Howard, T. M. 2001. Bulbs for warm climates. University of Texas Press. 276 p.
- Leitch, I. J., J. M. Beaulieu, M. W. Chaise, A. R. Leitch y M. F. Fay. 2010. Genome size dynamics and evolution in monocots. Journal of Botany 2010, 18 p. <http://www>.

- hindawi.com/journals/jb/2010/862516/; última consulta: 25.V.2012.
- Lenz, L. W. 1966. Chromosome numbers in the Allieae (Liliaceae). *Aliso* 6:81-82.
- Lenz, L. W. 1971. Chromosome numbers in the genus *Milla* Cav. (Liliaceae). *Aliso* 7:321-324.
- Levan, A., K. Fredga y A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-219.
- Lin, C. R., C. I. Peng, Y. Kono y Y. Liu. 2010. *Aspidistra obconica*, Asparagaceae (Ruscaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China. *Botanical Studies* 51:263-268.
- Malheiros-Gardé, N., D. de Castro y A. Cámara. 1947. Cromosomas sem centrómero localizado. O caso do *Luzula purpurea* Link. *Agronomia Lusitana* 9:51-47.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 1247 p.
- McNeal, D. W. 2003. *Milla biflora*. In *Flora of North America*, vol. 26: Magnoliophyta: Liliales: Liliales and Orchidales, flora of North America Editorial Committes. (eds.). Oxford University Press. Oxford. 347 p. Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=18&taxon_id=220008607; última consulta: 06.IV.2013.
- Meng, Y., Z. L. Nie, Y. P. Yang y Z. J. Gu. 2005. Karyomorphology of *Maianthemum* sensu lato (Polygonatae, Ruscaceae). *Journal of Plant Research* 118:155-162.
- Moore, H. E. 1953. The genus *Milla* (Amaryllidaceae-Allieae) and its allies. *Gentes Herbarum* 8:262-294.
- Navashin, M. S. 1928. Amphiplastie-eine neue karyologische erscheinung. *Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics* 5:1148-1152.
- Pires, J. C., M. F. Fay, W. S. Davis, L. Hufford, J. Rova, M. W. Chase y K. J. Sytsma. 2001. Molecular and morphological phylogenetic analyses of Themidaceae (Asparagales). *Kew Bulletin* 56:601-626.
- Pires, J., C. y K. J. Sytsma. 2002. A phylogenetic evaluation of a biosystematic framework: Brodiaeae and related pedaled monocots (Themidaceae). *American Journal of Botany* 89:1342-1359.
- Preuss, S. y C. S. Pikaard. 2007. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769:383-392.
- Raven, P. H. 1975. The basis of angiosperm phylogeny: cytology. *Annals of the Missouri Botanical Gardens* 62:724-764.
- Rojo, A. y J. Rodríguez. 2002. La flora del Pedregal de San Ángel. Instituto Nacional de Ecología, México, D. F. 95 p.
- Sinha, S. S. N. y H. Roy. 1979. Cytological studies in the genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in fourteen species. *Cytologia* 44:191-199.
- Song, K., P. Lu, K. Tank y T. C. Osborn. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 92:7719-7723.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley Publishing Reading. Massachusetts. 216 p.
- Tanaka, N. Y. y N. Tanaka. 1977. Chromosome studies in *Chionographis* (Liliaceae). I. On the holokinetic nature of chromosomes in *Chionographis japonica* Maxim. *Cytologia* 42:753-763.
- Tapia-Pastrana, F. 2007. Citogenética de *Guazuma ulmifolia* var. *ulmifolia* (Sterculiaceae). *Darwiniana* 45:23-27.
- Tapia-Pastrana, F. y P. Mercado-Ruaro. 2001. A combination of the “squash” and “splash” techniques to obtain the karyotype and assess meiotic behavior of *Prosopis laevigata* L. (Fabaceae: Mimosoideae). *Cytologia* 66:11-17.
- Tapia-Pastrana, F. 2012. Karyological characterisation of four American species of *Crotalaria* (Leguminosae: Papilionoideae) by the splash method. *Kew Bulletin* 67:427-433.
- Xu, J., Z. J. Yin, T. Funamoto y H. Peng. 2011. First report of chromosome numbers and karyotypes of two monotypic genera endemic to eastern Asia: *Brachystemma* (Caryophyllaceae) and *Craspedolobium* (Fabaceae). *Nordic Journal of Botany* 29:200-203.